

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 09096623 A

(43) Date of publication of application: 08 . 04 . 97

(51) Int. Cl

G01N 27/447
G01N 21/64

(21) Application number: 07252401

(71) Applicant: HITACHI LTD

(22) Date of filing: 29 . 09 . 95

(72) Inventor: ANAZAWA TAKASHI
 TAKAHASHI SATOSHI
 KANBARA HIDEKI

(54) CAPILLARY ARRAY ELECTROPHORESIS APPARATUS

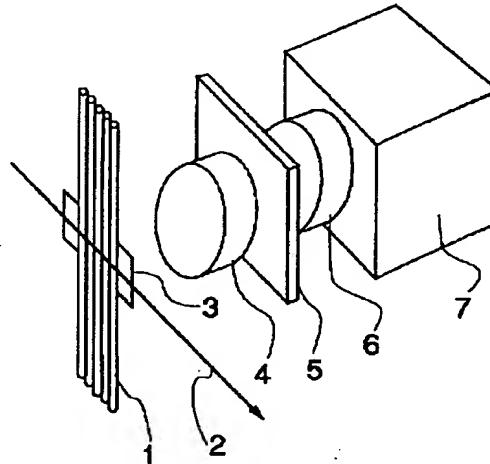
Accordingly, a high sensitivity, a high speed and a high throughput are realized simply.

(57) Abstract:

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

PROBLEM TO BE SOLVED: To perform on-column fluorometry for detecting fluorescence from sample components by radiating laser light onto a plurality of capillaries simultaneously.

SOLUTION: A polyimide coating of each capillary is removed by a predetermined length at a predetermined position from an electrophoresis start point of a capillary gel 1, which is an irradiation part with laser. The capillary gel is fixedly orientated flat on a glass flat plate 3 with axes of capillaries kept in parallel. A laser light is turned to a parallel luminous flux by a first camera lens 4 and passed through an image-splitting prism splitting an image in the vertical direction and a combined filter 5 of four kinds made correspond to the luminous flux forming the image. As a result, a fluorescent image is formed at a two-dimensional CCD camera 7 by a second camera lens 6. A predetermined relation is satisfied among the outer radius and inner radius of the capillaries, a refractive index of a medium outside the capillaries, refractive index of a material of the capillaries and refractive index of the gel, so that the laser light is refracted less by the capillaries and all of the capillaries with are irradiated a laser beam of a sufficient intensity.



特開平9-96623

(43)公開日 平成9年(1997)4月8日

(51)Int.Cl.
G 0 1 N 27/447
21/64

識別記号 庁内整理番号

F I
G 0 1 N 27/26
21/64
27/26

技術表示箇所

3 1 5 K
Z
3 1 5 F
3 2 5 B
3 2 5 E

審査請求 未請求 請求項の数21 OL (全18頁)

(21)出願番号 特願平7-252401
(22)出願日 平成7年(1995)9月29日(71)出願人 000005108
株式会社日立製作所
東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地
六沢 隆
(72)発明者 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究所内
高橋 智
(72)発明者 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究所内
神原 秀記
(74)代理人 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地
株式会社日立製作所中央研究所内
弁理士 小川 勝男

(54)【発明の名称】 キャビラリーアレイ電気泳動装置

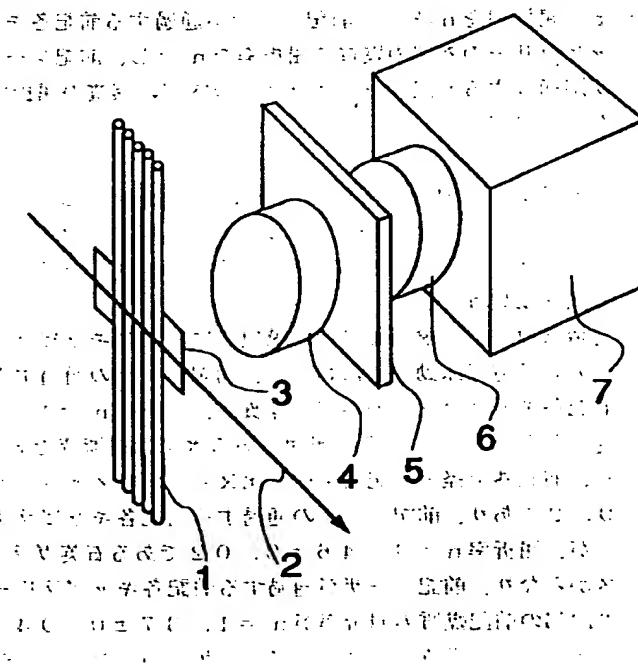
(57)【要約】

【課題】 キャビラリーアレイ電気泳動装置において、複数キャビラリーにレーザ光を同時照射し、試料成分からの蛍光を検出するオシカラム蛍光計測を行なう。

【解決手段】 キャビラリーゲル1の泳動開始点より所定の位置で、所定の長さで各キャビラリーのポリイミド被覆を除去してレーザ照射部とする。キャビラリーゲルをキャビラリー軸を平行に保ちガラス平面板3の上に平面状に固定配列する。蛍光像は第1カメラレンズ3で平行光束にし、像を垂直方向に分割する像分割プリズム及び像を結ぶ光束に対応させた4種の組み合わせフィルター5を透過させ、第2カメラレンズ6で2次元CCDカメラ7に結像させる。キャビラリーの外半径、内半径、キャビラリー外部の媒質の屈折率、キャビラリーの材料の屈折率、ゲルの屈折率の間に所定の関係を満足させて、レーザのキャビラリーによる屈折を小さくし全てのキャビラリーに十分な強度のレーザ光を照射する。

【効果】 高感度、高速、高スループットが簡便に実現できる。

図2



【特許請求の範囲】

【請求項1】泳動する試料の成分を検出する複数のキャビラリーの少なくとも一部が平面状に配列され、前記複数のキャビラリーにレーザを照射するキャビラリーアレイ電気泳動装置において、前記レーザを、前記少なくとも一部が配列する平面に平行な方向から、前記複数のキャビラリーに照射することを特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項2】請求項1に記載のキャビラリーアレイ電気泳動装置において、前記各キャビラリーの前記レーザが照射される部分が透明であることを特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項3】請求項1又は請求項2に記載のキャビラリーアレイ電気泳動装置において、前記レーザが、少なくとも3つの異なる屈折率をもつ媒質を透過することを特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項4】請求項1から請求項3のいずれかに記載のキャビラリーアレイ電気泳動装置において、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの外半径をR、内半径をr、屈折率をn₁とし、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの外部の媒質の屈折率をn₂とし、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの内部の媒質の屈折率をn₃とするとき、

$$(360/\pi) | \sin^{-1}(r/(2R)) - \sin^{-1}(rn_1/(2Rn_2)) | + \sin^{-1}(n_1/(2n_3)) - \sin^{-1}(n_1/(2n_2)) | \leq 6.2^\circ$$

なる関係を満たすことを特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項5】請求項1から請求項3のいずれかに記載のキャビラリーアレイ電気泳動装置において、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの外半径をR、内半径をr、屈折率をn₁とし、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの外部の媒質の屈折率をn₂とし、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの内部の媒質の屈折率をn₃とするとき、

$$(360/\pi) | \sin^{-1}(r/(2R)) - \sin^{-1}(rn_1/(2Rn_2)) | + \sin^{-1}(n_1/(2n_3)) - \sin^{-1}(n_1/(2n_2)) | \leq 1.2^\circ$$

なる関係を満たすことを特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項6】請求項4又は請求項5に記載のキャビラリーアレイ電気泳動装置において、前記レーザの通過する前記各キャビラリーの外部の媒質が、屈折率n₁=1.

33からn₁=1.37の範囲にある水又は緩衝液であり、前記外半径と前記内半径の比R/rがR/r=2±0.2であり、前記レーザの通過する前記各キャビラリーが、屈折率n₂=1.46±0.02である石英ガラスからなり、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの内部の前記媒質の屈折率がn₃=1.37±0.04であり、前記媒質がアクリルアミドゲルからなることを

特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項7】請求項4又は請求項5に記載のキャビラリーアレイ電気泳動装置において、前記レーザの通過する前記各キャビラリーの外部の媒質が、屈折率n₁=1.

33からn₁=1.37の範囲にある水又は緩衝液であり、前記外半径と前記内半径の比R/rがR/r=2±0.2であり、前記レーザの通過する前記各キャビラリーが、屈折率n₂=1.46±0.02である石英ガラスからなり、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの内部の前記媒質の屈折率がn₃=1.40±0.04であり、前記媒質がホルムアミドを混入させたアクリルアミドゲルからなることを特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項8】請求項4又は請求項5に記載のキャビラリーアレイ電気泳動装置において、前記レーザの通過する前記各キャビラリーの外部の媒質が、屈折率n₁=1.

00の空気であり、前記外半径と前記内半径の比R/rがR/r=5±0.5であり、前記レーザの通過する前記各キャビラリーが、屈折率n₂=1.46±0.02

である石英ガラスからなり、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの内部の前記媒質の屈折率がn₃=1.37±0.04であり、前記媒質がアクリルアミドゲルからなることを特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項9】請求項4又は請求項5に記載のキャビラリーアレイ電気泳動装置において、前記レーザの通過する前記各キャビラリーの外部の媒質が、屈折率n₁=1.

00の空気であり、前記外半径と前記内半径の比R/rがR/r=3±0.3であり、前記レーザの通過する前

記各キャビラリーが、屈折率n₂=1.60±0.02であるガラスからなり、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの内部の前記媒質の屈折率がn₃=1.37±0.04であり、前記媒質がアクリルアミドゲルからなることを特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項10】泳動する試料の成分を検出する複数のキャビラリーの少なくとも一部が平面状に配列され、前記複数のキャビラリーにレーザを照射するキャビラリーアレイ電気泳動装置において、前記レーザを、前記少なくとも一部が配列する平面の1つ又は2つの側方より、前記平面に平行な方向から前記複数のキャビラリーに照射することを特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項11】泳動する試料の成分を検出する複数のキャビラリーの少なくとも一部が平面状に配列され、前記複数のキャビラリーにレーザを照射するキャビラリーアレイ電気泳動装置において、前記キャビラリーの外半径、内半径、前記キャビラリー外部の媒質の屈折率、前記キャビラリーの材料の屈折率、前記キャビラリー内部の媒質の屈折率の間に所定の関係を満足させて、前記レ

ーザのキャビラリーによる屈折を小さくし、全ての前記キャビラリーに前記レーザ光を照射することを特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項12】請求項10又は請求項11に記載のキャビラリーアレイ電気泳動装置において、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの外半径をR、内半径をr、屈折率をn₁とし、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの外部の媒質の屈折率をn₂とし、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの内部の媒質の屈折率をn₃とするとき、

$$(360/\pi) [\sin^{-1}(r/(2R)) - \sin^{-1}(rn/(2Rn_2))] + \sin^{-1}(n_1/(2n_2)) - \sin^{-1}(n_1/(2n_3)) \leq 6.2^\circ$$

なる関係を満たすことを特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項13】請求項10又は請求項11に記載のキャビラリーアレイ電気泳動装置において、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの外半径をR、内半径をr、屈折率をn₁とし、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの外部の媒質の屈折率をn₂とし、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの内部の媒質の屈折率をn₃とするとき、

$$(360/\pi) [\sin^{-1}(r/(2R)) - \sin^{-1}(rn/(2Rn_2))] + \sin^{-1}(n_1/(2n_2)) - \sin^{-1}(n_1/(2n_3)) \leq 1.2^\circ$$

なる関係を満たすことを特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項14】請求項10から請求項13のいずれかに記載のキャビラリーアレイ電気泳動装置において、前記レーザの通過する前記各キャビラリーの外部の媒質が、屈折率n₁=1.33からn₁=1.37の範囲にある水又は緩衝液であり、前記外半径と前記内半径の比R/rがR/r=2±0.2であり、前記レーザの通過する前記各キャビラリーが、屈折率n₂=1.46±0.02である石英ガラスからなり、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの内部の前記媒質の屈折率がn₃=1.37±0.04であり、前記媒質がアクリルアミドゲルからなることを特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項15】請求項10又は請求項11に記載のキャビラリーアレイ電気泳動装置において、前記レーザの通過する前記各キャビラリーの外部の媒質が、屈折率n₁=1.33からn₁=1.37の範囲にある水又は緩衝液であり、前記外半径と前記内半径の比R/rがR/r=2±0.2であり、前記レーザの通過する前記各キャビラリーが、屈折率n₂=1.46±0.02である石英ガラスからなり、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの内部の前記媒質の屈折率がn₃=1.40±0.04であり、前記媒質がホルムアミドを混入させたアクリルアミドゲルからなることを特徴とするキャビラリー

アレイ電気泳動装置。

【請求項16】請求項10又は請求項11に記載のキャビラリーアレイ電気泳動装置において、前記レーザの通過する前記各キャビラリーの外部の媒質が、屈折率n₁=1.00の空気であり、前記外半径と前記内半径の比R/rがR/r=5±0.5であり、前記レーザの通過する前記各キャビラリーが、屈折率n₂=1.46±0.02である石英ガラスからなり、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの内部の前記媒質の屈折率がn₃=1.37±0.04であり、前記媒質がアクリルアミドゲルからなることを特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項17】請求項10又は請求項11に記載のキャビラリーアレイ電気泳動装置において、前記レーザの通過する前記各キャビラリーの外部の媒質が、屈折率n₁=1.00の空気であり、前記外半径と前記内半径の比R/rがR/r=3±0.3であり、前記レーザの通過する前記各キャビラリーが、屈折率n₂=1.60±0.02であるガラスからなり、前記レーザが通過する前記各キャビラリーの内部の前記媒質の屈折率がn₃=1.37±0.04であり、前記媒質がアクリルアミドゲルからなることを特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項18】泳動する試料の成分を検出する複数のキャビラリーの少なくとも一部が平面状に配列され、前記複数のキャビラリーにレーザを照射するキャビラリーアレイ電気泳動装置において、キャビラリーアレイ又は前記レーザのスキャンを行なうことなく、前記複数のキャビラリーに前記レーザを実質的に同時に照射して、前記の各キャビラリー中を泳動する前記試料の成分から発する蛍光を実質的に同時に検出するために、前記レーザを、前記少なくとも一部が配列する平面の1つ又は2つの側方より、前記平面に平行な方向から前記複数のキャビラリーに照射することを特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項19】泳動する試料の成分を検出する複数のキャビラリーの少なくとも一部が平面状に配列され、前記複数のキャビラリーにレーザを照射するキャビラリーアレイ電気泳動装置において、キャビラリーアレイ又は前記レーザのスキャンを行なうことなく、前記複数のキャビラリーに前記レーザを実質的に同時に照射して、前記の各キャビラリー中を泳動する前記試料の成分から発する蛍光を実質的に同時に検出するために、前記キャビラリーの外半径、内半径、前記キャビラリー外部の媒質の屈折率、前記キャビラリーの材料の屈折率、前記キャビラリー内部の媒質の屈折率の間に所定の関係を満足させて、前記レーザのキャビラリーによる屈折を小さくし、全ての前記キャビラリーに前記レーザ光を照射することを特徴とするキャビラリーアレイ電気泳動装置。

【請求項20】請求項18又は請求項19に記載のキャビラリー

ピラリー・アレイ電気泳動装置において、前記レーザが通過する前記各キャピラリーの外半径をR、内半径をr、屈折率をn₂とし、前記レーザが通過する前記各キャピラリーの外部の媒質の屈折率をn₁とし、前記レーザが通過する前記各キャピラリーの内部の媒質の屈折率をn₃とするとき、

$$(360/\pi) | \sin^{-1} \{ r/(2R) \} - \sin^{-1} \{ r n_1 / (2R n_2) \} | + \sin^{-1} \{ n_1 / (2 n_2) \} - \sin^{-1} \{ n_1 / (2 n_3) \} | \leq 6.2^\circ$$

なる関係を満たすことを特徴とするキャピラリー・アレイ電気泳動装置。
10

【請求項21】請求項18又は請求項19に記載のキャピラリー・アレイ電気泳動装置において、前記レーザが通過する前記各キャピラリーの外半径をR、内半径をr、屈折率をn₂とし、前記レーザが通過する前記各キャピラリーの外部の媒質の屈折率をn₁とし、前記レーザが通過する前記各キャピラリーの内部の媒質の屈折率をn₃とするとき、

$$(360/\pi) | \sin^{-1} \{ r/(2R) \} - \sin^{-1} \{ r n_1 / (2R n_2) \} | + \sin^{-1} \{ n_1 / (2 n_2) \} - \sin^{-1} \{ n_1 / (2 n_3) \} | \leq 1.2^\circ$$

なる関係を満たすことを特徴とするキャピラリー・アレイ電気泳動装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、DNA、RNA、又は蛋白質等の分離分析装置に係る技術分野に属し、特にDNA、RNAの塩基配列決定、あるいは個体の塩基配列の多様性に基づく制限酵素断片の多型性の計測を行なうキャピラリー・アレイ電気泳動装置に係る技術分野に属する。

【0002】

【従来の技術】DNA、RNA等の分析技術は、遺伝子解析や遺伝子診断を含む医学、生物学の分野でますます重要になってきている。特に最近、特にゲノム解析計画に関連して、高速、高スループットのDNA解析装置の開発が進んでいる。DNA解析では、蛍光標識された試料をゲル電気泳動によって分子量分離し、試料にレーザを照射して蛍光標識から発する蛍光を検出し、検出される一連の信号を解析する。ゲル電気泳動では、0.3m程度の間隔に保持された2枚のガラス板の間で、アクリルアミドを重合させた平板ゲルが広く使用されている(スラブゲル電気泳動)。平板ゲルの上端(一端)の泳動開始点に注入された試料は、平板ゲルの両端に印加された電界により分子量分離されながら下端(他端)方向に泳動される。泳動開始点から一定距離の位置において、平板ゲルの側面からレーザを照射して、全ての泳動路を一度に照射し、レーザ照射部を通過する蛍光標識された試料の泳動分離された成分を励起する。レーザ照射により発する蛍光の検出は、一定時間間隔で連続して周

期的に検出する。この検出結果を解析することによりDNA塩基配列を決定している。

【0003】最近では平板ゲルに替わり、溶融石英製の毛細管内にゲルを重合させたキャピラリーゲルが使用されるようになった。キャピラリーゲル電気泳動は、上記のスラブゲル電気泳動に比較して、大きな電界を加えることができ、高速、高分離が可能な方法として注目を集めている(A n a l y t i c a l C h e m i s t r y 62, 900 (1990))。通常、キャピラリーゲル電気泳動装置では、1本のキャピラリー管を用い、その下端近傍のキャピラリー中をレーザ照射し、蛍光標識された試料から発する蛍光を検出するオンカラム計測を行なっている。キャピラリーの外表面全体はポリイミドコーティングされているので、蛍光を検出する位置のコーティングを除去してガラスを露出させておく(米国特許5312535(May 17, 1994))。このガラスが露出した位置に照射されるレーザにより、電気泳動によってキャピラリー内部を泳動する蛍光標識された試料の泳動分離された成分が励起され蛍光を発する。

20 この蛍光を一定時間間隔で連続して周期的に検出し、解析することによりDNA塩基配列を決定している。しかし、上記のオンカラム計測装置では、レーザビームのキャピラリー表面での屈折が大きいために、1度に1本のキャピラリーしか使用できず、スループットが上がらないという難点があった。そこで最近、複数本のキャピラリーをアレイ化して、多くの試料を同時に高速分析する高スループットなキャピラリー・アレイ・ゲル電気泳動装置がいくつか報告されている。

【0004】第1の報告例は、キャピラリー・アレイ・スキ30 ャン方式(Nature, 359, 167 (1992))であり、複数本のキャピラリーを1本づつ順番にレーザ照射し、オンカラム蛍光計測するものである。この装置では、レーザビームがキャピラリー内で最も絞られる位置と、蛍光受光光学系に入射する光源位置とが一致する共焦点構造が採用されており、1本づつのキャピラリーを独立に計測できる。レーザ照射及び蛍光受光光学系は固定し、キャピラリー・アレイを保持したステージを1次元方向に移動させて、各キャピラリーを順番にレーザ照射している。第2の報告例は、キャピラリー・アレイ・シースフロー方式(Nature, 361, 565-566 (1993)、特開平06-138037号公報)である。この装置では、キャピラリー・アレイの下端を緩衝液中に浸し、ゲル電気泳動によって分子量分離された試料の成分をそのまま緩衝液中に溶出させ、キャピラリーの存在しない空間部分で、試料の成分から発する蛍光を検出する、オフカラム計測(キャピラリーにレーザ照射して試料の成分を検出するオンカラム計測に対比して、本願明細書では、キャピラリーの存在しない空間にレーザ照射して試料の成分を検出する方式を、簡単のためオフカラム計測と呼ぶことにする。)を行なってい

40 50

る。

【0005】また、緩衝液を泳動方向にゆっくり流すことによって、異なるキャビラリーゲルから溶出された分離成分の緩衝液中での混合、あるいは1本のキャビラリーゲル中で分離されていた異なる2つの成分の緩衝液中の混合を防止している。キャビラリーアレイの出口近傍で、キャビラリーが存在せず緩衝液が存在する空間部分を、レーザ照射してキャビラリーの表面でのレーザビームの散乱の問題を回避し、複数のキャビラリーから溶出された成分を、実質的に一括して励起し、実質的に同時に蛍光検出することが可能になっている。

【0006】第3の報告例では、複数のキャビラリーを機械的にスキャンすることなく、複数のキャビラリーを同時にオンカラム計測するために、単一のレーザ光源からのレーザ光をビームスプリッター等により分割して、複数のキャビラリーのそれぞれに同時照射している (Analytical Chemistry 65, 956 (1993))。

【0007】第4の報告例では、レーザ光をシリンドリカルレンズでキャビラリー配列方向に拡げて、複数のキャビラリーに一括して照射している (Analytical Chemistry 66, 1424 (1994))。

【0008】
【発明が解決しようとする課題】上記第1の報告例のキャビラリーアレイスキャン方式では、蛍光計測をキャビラリー1本づつ順番に行なうため、1本当たりの蛍光検出に要する時間が、1本のキャビラリーを使用する通常のオンカラム計測と比較して減少してしまう。 n 本のキャビラリーアレイを使用する場合、通常のオンカラム計測と比較して、1本当たりの蛍光検出に要する時間は最大で $1/n$ 、実際には試料の分離成分が通過しないキャビラリーのガラス部分もスキャンされるので $1/n$ 以下になってしまう。この結果、蛍光検出感度が低下する問題が生じる。即ち、 n 本のキャビラリーアレイを使用する場合に、1本のキャビラリーを使用する通常のオンカラム計測と同等の蛍光検出感度を得るために、通常のオンカラム計測における蛍光を検出時間の n 倍以上の時間を要することになってしまう。

【0009】また、1本のキャビラリー中で分離される成分の電気泳動パターンの隣り合うピークの時間間隔は、高速分析になるほど小さくなるが、この隣り合うピークの時間間隔に対して、 n 本のキャビラリーアレイの1回のスキャンに要する時間が無視できないほど大きくなると、分離された成分の電気泳動パターンの分離能が低下する問題が生じる。更に、本装置では、スキャンを機械的に行なうためのステージ可動部を有しており、故障が多発する構造となっている。

【0010】上記第2の報告例のキャビラリーアレイシースロー方式では、分子量分離された成分から得られ

る蛍光強度が、オンカラム蛍光計測の場合と比較して、分子量が多くなるほど小さくなってしまうという問題がある。この問題は、次の理由により生じる。キャビラリーゲルの下端より緩衝液中に溶出された分離成分が、緩衝液中で拡散等によって混合しないようにするために、緩衝液を泳動方向に一定の速度以上で定常的に流す必要がある。一方、キャビラリーゲル中を分子量分離されながら泳動する試料成分の泳動速度は、その分子量が多いほど小さくなる。緩衝液のフロー速度に対して、キャビラリーゲル中の試料成分の泳動速度が小さいほど、その試料成分はキャビラリーゲルから緩衝液中に溶出される際に、泳動方向に大きく引き伸ばされることになる。その結果、蛍光強度が小さくなり、計測感度が低下する原因となる。

【0011】上記第3、第4の報告例では、キャビラリー1本当たりに照射されるレーザ光強度が低下するため、電気泳動により分離される試料成分を感度よく検出できないという問題がある。

【0012】本発明の目的は上記した各種の問題を解決するため、オンカラム蛍光計測を行ないながら、複数のキャビラリーを機械的にスキャンせず、あるいはレーザをスキャンすることなく、複数のキャビラリーを実質的に同時にレーザ照射して、複数のキャビラリー中の試料成分から発する蛍光を、実質的に同時に一括して計測できるキャビラリーアレイ電気泳動装置を提供することにある。

【0013】
【課題を解決するための手段】本発明のキャビラリーアレイ電気泳動装置は、泳動する試料の成分を検出するための複数のキャビラリーの少なくとも一部が平面状に配列され、複数のキャビラリーにレーザ光を照射するキャビラリーアレイ電気泳動装置において、(1) レーザ光を、上記少なくとも一部が配列する平面に平行な方向から複数のキャビラリーに照射すること、(2) レーザ光を、上記少なくとも一部が配列する平面の1つ又は2つの側方より、上記平面に平行な方向から複数のキャビラリーに照射すること、(3) キャビラリーの外半径、内半径、キャビラリー外部の媒質の屈折率、キャビラリーの材料の屈折率、キャビラリー内部の媒質の屈折率の間に所定の関係を満足させて、上記レーザ光のキャビラリーによる屈折を十分小さくし、全てのキャビラリーに十分な強度を有するレーザ光を照射すること、(4) キャビラリーアレイ又はレーザ光のスキャンを行なうことなく、複数のキャビラリーにレーザ光を実質的に同時に照射して、上記の各キャビラリー中を泳動する試料の成分から発する蛍光を実質的に同時に検出するために、上記レーザ光を、上記少なくとも一部が配列する平面の1つ又は2つの側方より、前上平面に平行な方向から複数のキャビラリーに照射すること、(5) キャビラリーアレイ又は前記レーザ光のスキャンを行なうことなく、複

数のキャビラリーにレーザ光を実質的に同時に照射して、上記の各キャビラリー中を泳動する試料の成分から発する蛍光を実質的に同時に検出するため、キャビラリーの外半径、内半径、前記キャビラリー外部の媒質の屈折率、キャビラリーの材料の屈折率、キャビラリー内部の媒質の屈折率の間に所定の関係を満足させて、レーザ光のキャビラリーによる屈折を十分小さくし、全てのキャビラリーに十分な強度を有するレーザ光を照射すること、に特徴を有するキャビラリーアレイ電気泳動装置である。

【0014】さらに、本発明のキャビラリーアレイ電気泳動装置は、上記特徴(1)から(5)に加えて、

(a) 上記各キャビラリーのレーザ光が照射される部分が透明であること、上記レーザ光が、少なくとも3つの異なる屈折率をもつ媒質を透過すること、(b) 上記レーザ光が通過する各キャビラリーの外半径をR、内半径をr、屈折率をn₁とし、レーザ光が通過する各キャビラリーの外部の媒質の屈折率をn₂とし、レーザ光が通過する各キャビラリーの内部の媒質の屈折率をn₃とするととき、 $(360/\pi) + \sin^{-1}\{r/(2R)\} - \sin^{-1}\{r(n_1/(2Rn_2))\} + \sin^{-1}\{n_1/(2n_2)\} \leq 6.12^\circ$ なる関係を満たすことあるいは、(c) $(360/\pi) + \sin^{-1}\{r/(2R)\} - \sin^{-1}\{r(n_1/(2Rn_2))\} + \sin^{-1}\{n_1/(2n_3)\} - \sin^{-1}\{n_3/(2n_2)\} \leq 1.12^\circ$ なる関係を満たすことあるいは、(d) レーザ光の通過する各キャビラリーの外部の媒質が、屈折率n₁=1.33からn₁=1.37の範囲にある水又は緩衝液であり、上記外半径と上記内半径の比R/rがR/r=2±0.2であり、レーザ光の通過する各キャビラリーが、屈折率n₂=1.46±0.02である石英ガラスからなり、レーザ光が通過する各キャビラリーの内部の媒質の屈折率がn₃=1.3±0.04であり、この媒質がアクリルアミドゲルからなること、(e) レーザ光の通過する各キャビラリーの外部の媒質が、屈折率n₁=1.33からn₁=1.37の範囲にある水又は緩衝液であり、上記外半径と内半径の比R/rがR/r=2±0.2であり、レーザ光の通過する各キャビラリーが、屈折率n₂=1.46±0.02である石英ガラスからなり、レーザ光が通過する各キャビラリーの内部の媒質の屈折率がn₃=1.3±0.04であり、この媒質がホルムアミドを混入させたアクリルアミドゲルからなること、(f) レーザ光の通過する各キャビラリーの外部の媒質が、屈折率n₁=1.00の空気であり、上記外半径と内半径の比R/rがR/r=5±0.5であり、レーザ光の通過する各キャビラリーが、屈折率n₂=1.46±0.02である石英ガラスからなり、レーザ光が通過する各キャビラリーの内部の媒質の屈折率がn₃=1.37±0.04

であり、この媒質がアクリルアミドゲルからなること、(g) レーザ光の通過する各キャビラリーの外部の媒質が、屈折率n₁=1.00の空気であり、上記外半径と内半径の比R/rがR/r=3±0.3であり、レーザ光の通過する各キャビラリーが、屈折率n₂=1.60±0.02であるガラスからなり、レーザ光が通過する各キャビラリーの内部の媒質の屈折率がn₃=1.37±0.04であり、この媒質がアクリルアミドゲルからなること、等にも特徴を有する。

【0015】
【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態を図を参照して詳細に説明する。図1は、複数のキャビラリー1(図1では、6本の例を示す)を同一平面上に配列し、この平面と平行であり、試料成分の泳動方向とほぼ直交する方向からレーザ2を照射して、複数のキャビラリーを実質的に同時に励起して、各キャビラリー中で分離される試料成分をオシロスコープ計測して検出するキャビラリーアレイ電気泳動装置の主要部分を示す。図1(a)は、複数のキャビラリーアレイの平面図、図1(b)は、その断面図である。レーザ2が照射される複数のキャビラリー1は、試料成分を分離するための分離用キャビラリー、もしくは分離用キャビラリーに接続され泳動分離された試料成分を検出するための計測用キャビラリーのいずれかである。レーザ2が照射される複数のキャビラリー1が分離用キャビラリーである場合には、試料の泳動開始点から所定の距離でレーザ2を照射する。これらの各キャビラリーには、ゲルが充填されている。本発明のキャビラリーアレイ電気泳動装置で泳動分析、又は解析される試料は、蛍光標識されている複数の成分30を含んでいる。また、試料に含まれる成分自身が、レーザの照射により蛍光を発する性質をもっている場合には、蛍光標識は不要である。なお、図1を含め以下で参照する各図では、泳動のための電界を印加するための電源、電極、電極及び電解液を収納する電極層等の各手段、更に、キャビラリーゲル1の中を泳動する試料成分からの蛍光を検出した後、これら検出信号を処理する演算処理装置、演算処理結果の表示を行なう表示器、キャビラリーアレイ電気泳動装置の各部を制御する制御装置、レーザ光源等は省略してある。

【0016】(第1の実施形態) 本実施形態は、5本のキャビラリーゲル電気泳動によるDNA塩基配列決定のための装置であり、その装置の基本構成を図2に示した。但し、図2には、5本のキャビラリーゲル1の中を泳動する試料成分を検出する蛍光計測部分近傍のみを示す。キャビラリーゲル1は、長さ50cm、外径0.2mm(外半径R=0.1mm)、内径0.1mm(内半径r=0.05mm)の溶融石英管(屈折率=1.46)に、変性剤として7Mのウレアを含んだ4%TGA(Total monomer concentration 50 mol)、5%C(Crosslinking mate

rial concentration) の濃度のアクリルアミドを注入した後ゲル化させて調製した(屈折率=1.37)。試料注入側のキャピラリー末端より30cmの位置で、長さ10mmにわたり、各キャピラリーのポリイミド被覆を除去してレーザ照射部とした。図2のように、このキャピラリーゲル5本をそれぞれキャピラリー軸を平行に保ち、0.2mmピッチに揃えてガラス平面板3の上に固定して平面状に配列させた。図3に示すように、キャピラリーゲルを取り巻く媒質は、空気9である(屈折率=1.00)。

【0017】図3は、蛍光計測部分のキャピラリー軸に垂直な断面図であり、YAGレーザ(532nm、20mW)、及びHe-Neレーザ(594nm、10mW)を同軸にした後、ビーム2の径を0.1mmに絞り、キャピラリーが配列する平面に平行であり、キャピラリー軸にほぼ垂直な方向から入射させた(即ち、キャピラリーアレイの側方からビーム2を入射させる)。蛍光の計測は、キャピラリーゲルが配列する平面に対して垂直方向からガラス平面板3を通して行なった。図3に示すように、蛍光の計測は、ガラス平面板3の反対の側から行なうこともできる。

水平方向に幅0.8mmに、0.2mm間隔で1列に並ぶ5個の蛍光発光点群を、図2に示す構成により、第1カメラレンズ3でほぼ平行光束にし、像を垂直方向に4つに分割する像分割プリズム及び4つの像を結ぶ光束に対応させた4種の組み合わせフィルター5を透過させ、第2カメラレンズ6で、2次元CCDカメラ7に結像させた。なお、この蛍光選別法は特開平02-269936号公報に詳しく記されている。5×4=20個からなる2次元状に展開された蛍光発光点群を、冷却型の2次元CCDカメラ7に一度に露光させ計測した。この計測は、露光時間1.0秒、データ取得間隔1.5秒で連続的に行なった。

【0018】5種のDNA試料の塩基配列決定はサンガーフラッシュ法に従って行なった。試料は5種ともに標準試料のM13mp18である。調製されたDNA試料成分には、末端塩基種C、G、A、Tに対応して4種の蛍光体Cy3(極大発光波長565nm)、TRITC(極大発光波長580nm)、Texas Red(極大発光波長615nm)、Cy5(極大発光波長665nm)を標識した。ここで、蛍光体Cy3、Cy5は、バイオロジカル・ディテクション・システム社(米国)より販売されている蛍光体、TRITC、Texas Redはモレキュラー・プローブ社より販売されている蛍光体である。これら4種の蛍光体から発する蛍光が、波長選別されて2次元CCDカメラ7に結像されるように、4種の組み合わせフィルター5を用いた。末端塩基種に対応した4種の反応物を試料種毎に混合した後、エタノール沈殿によって10倍に濃縮して試料溶媒をホルムアミドに置換した。5本のキャピラリーゲルのそれぞれの試料注

入端を、5種のDNA試料液中に対応させて浸し、キャピラリーゲルの両端に100V/cm(3kV)の一定電界強度を2秒間印加して試料注入を行なった。この結果、5本のキャピラリーゲルのそれぞれの泳動開始点に、異なるDNA試料が添加される。

【0019】電気泳動は一定電界強度100V/cm(3kV)で約3時間行なった。2次元CCDカメラ7で得られた4種の蛍光に対応する4種の信号の時間変化をコンピュータで解析し、塩基配列決定を行なうことができたが、レーザ2が射出する側の2本のキャピラリーからの蛍光強度は、レーザの入射する側のキャピラリーより一桁近く低かった。

【0020】(第2の実施形態)複数のキャピラリーに対して、より効率の良い同時レーザ照射を実現するために、レーザ光の収束条件を検討し、最適条件下で計測を行なった例を、以下に説明する。キャピラリーが円筒形であるため、各キャピラリーそのものがレンズ作用をもち、照射されたレーザビームは1本目のキャピラリーを透過する際に大きく屈折を受ける。屈折は全てのキャピラリーで起こるので、各キャピラリーに到達し入射するレーザ光の強度は、ほぼ指数関数的に減少してしまうので、従って各キャピラリー中の試料成分から発する蛍光の強度も、使用するキャピラリーの本数に応じて、ほぼ指数関数的に減少してしまうことになる。

【0021】図4は、外半径R₁(2.3)、内半径R₂(2.4)をもつキャピラリー断面図であり、キャピラリーの軸から、距離x(10)だけ離れた位置に入射した無限小幅のレーザビーム2の1本のキャピラリーによる屈折の様子を示している。図4では、複数のキャピラリーの各軸が配列するキャピラリー配列軸19上の、キャピラリーの軸Oをもつ1本のキャピラリーの断面を示し、他の複数のキャピラリーは省略している。

【0022】キャピラリー外部の媒質20の屈折率はn₁、キャピラリーの材料21の屈折率はn₂、キャピラリー内部の媒質22の屈折率はn₃である。キャピラリーに入射する前のレーザビームと、キャピラリーを透過後のレーザビームとがなす角を屈折角 $\Delta\theta$ とすると、 $\Delta\theta$ は図4から、(数1)で与えられる。なお、 θ_1 はキャピラリー外部の媒質からキャピラリーへの入射角11、 θ_2 はキャピラリー外部の媒質からキャピラリーへの屈折角12、 θ_3 はキャピラリー材料からキャピラリー内部の媒質への入射角13、 θ_4 はキャピラリー材料からキャピラリー内部の媒質への屈折角14、 θ_5 はキャピラリー内部の媒質からキャピラリー材料への入射角15、 θ_6 はキャピラリー内部の媒質からキャピラリー材料への屈折角16、 θ_7 はキャピラリー材料からキャピラリー外部の媒質への入射角17、 θ_8 はキャピラリー材料からキャピラリー外部の媒質への屈折角18である。

【0023】

【数1】

$$\begin{aligned}\Delta\theta &= (\theta_1 - \theta_2) + (\theta_3 - \theta_4) - (\theta_5 - \theta_6) - (\theta_7 - \theta_8) \\ &= 2(\theta_1 - \theta_2 + \theta_3 - \theta_4)\end{aligned}$$

ここで $\theta_1 = \theta_6$ 、 $\theta_2 = \theta_7$ 、 $\theta_3 = \theta_8$ 、 $\theta_4 = \theta_5$ の関係を用いた。図4に示すレーザビーム2のたどる光路の幾何学的関係、及び異なる媒質の界面におけるSnellの法則を用いると、(数1)から(数5)が成立し、*

$$\sin\theta_1 = x/R$$

【0025】

$$\sin\theta_1 / \sin\theta_2 = n_1 / n_2$$

【0026】

$$\sin\theta_2 / \sin\theta_3 = r/R$$

【0027】

$$\sin\theta_3 / \sin\theta_4 = n_2 / n_1$$

【0028】

$$\begin{aligned}\Delta\theta &= 2 \{ \sin^{-1}(x/R) - \sin^{-1}(x n_1 / (R n_2)) \\ &\quad + \sin^{-1}(x n_1 / (r n_2)) - \sin^{-1}(x n_1 / (r n_3)) \}\end{aligned}$$

…(数1)

* (数6)を得る。

【0024】

【数2】

…(数2)

【数3】

…(数3)

【数4】

…(数4)

【数5】

…(数5)

【数6】

…(数6)

※心軸がキャビラリーの中心軸に入射した場合、複数のキャビラリーの中心軸が配列する配列軸から垂直な方向に、キャビラリーの内半径のほぼ半分の距離の位置で、レーザ强度はほぼ、上記ガウス分布の半価幅を与える強度となる。そこで、簡単のためキャビラリーの配列軸1より内半径 r の $1/2$ の距離だけ離れた位置に入射したレーザビーム(即ち、 $x = r/2$)のみに着目すると(数6)は、

【0030】

【数7】

$$\left| \Delta\theta \right| = \left| \sin^{-1}(x / (2R)) - \sin^{-1}(r n_1 / (2R n_2)) + \sin^{-1}(n_1 / (2n_2)) \right|$$

…(数7)

★でのレーザ强度が、1本目のキャビラリーでのレーザ强度の $(1/10)$ 以上であることが、N本目のキャビラリーの中を泳動する試料を同時に励起するための、同時励起条件であるとすると、この条件は上記の変位が、 $r/2$ の $\sqrt{(10) - 1}$ 倍以下であればよいと言え換えることができる。即ち、(数8)が成立し、

【0032】

【数8】

…(数8)

☆ると、(数8)は $|\Delta\theta| \leq 6.2^\circ$ となり、(数7)から上記同時励起条件は(数9)と表わすことができる。

【0034】

【数9】

$$\left| \sin^{-1}(r n_1 / (2R n_2)) - \sin^{-1}(n_1 / (2n_2)) \right| \leq 6.2$$

…(数9)

(数6)で与えられる $\Delta\theta$ の大きさが十分に小さければ、レーザ光強度の減衰をより少なくて、図1から図3に示す構成により、複数のキャビラリーに対して、より効率の良い同時レーザ照射を実現し、各キャビラリーを泳動する試料成分を実質的に同時に励起することができる。

【0029】通常、キャビラリーへのレーザ照射は、レーザをキャビラリーの内径程度に絞って行なう。通常の場合、レーザ强度は、レーザビームの中心軸を対称軸としたガウス分布になっている。即ち、レーザビームの中※

$$\left| \Delta\theta \right| = \left| (360/\pi) \sin^{-1}(x / (2R)) - \sin^{-1}(r n_1 / (2R n_2)) + \sin^{-1}(n_1 / (2n_2)) \right|$$

と表わせる。

【0031】複数のキャビラリーの中を泳動する試料を同時に励起するため、レーザビームが空間的にどの程度広がるかを考える。はじめにレーザビームが入射する1本目のキャビラリーから、N本先のキャビラリーの位置で、キャビラリーの中心軸が配列する配列軸の方向と垂直な方向への、レーザビームの変位は、近似的に、 $|NR\Delta\theta|$ により、与えられる。N本目のキャビラリー★

$$|NR\Delta\theta| \leq \sqrt{(10) - 1} r/2$$

(数8)が、N本のキャビラリーの上記同時励起条件となる。

【0033】ここで、同時に励起すべきキャビラリーの本数を5本以上($N \geq 5$)とする。キャビラリーの外形と内径の比 R/r は、通常 $R/r \geq 2$ であることを考え

$$\left| (360/\pi) \sin^{-1}(x / (2R)) - \sin^{-1}(r n_1 / (2R n_2)) + \sin^{-1}(n_1 / (2n_2)) \right| \leq 6.2$$

N本目のキャビラリーでのレーザ强度が、1本目のキャ

が、N本目のキャビラリーでの上記同時励起条件であるとすると、この条件は、(数8)と同様にして、(数10)となる。

$$|NR\Delta\theta| \leq \{\sqrt{(2) - 1}\} r / 2$$

* [0035]

【数10】

*

… (数10)

$N \geq 5$ 、及び $R/r \geq 2$ を考慮して、 $|\Delta\theta| \leq 1.2$ ※ [0036]

となり (数7) から、上記同時励起条件は (数11) と表わすことができる。

$$(360/\pi) |\sin^{-1}(r/(2R)) - \sin^{-1}(rn_2/(2Rn_2))| + |\sin^{-1}(n_1/(2n_2)) - \sin^{-1}(n_1/(2n_1))| \leq 1.2$$

※

… (数11)

図5は、 $|\Delta\theta|$ の変化を (数7) を用いて計算した結果であり、キャビラリーの外半径 $R = 0.1\text{ mm}$ 、内半径 $r = 0.05\text{ mm}$ 、キャビラリーの材料を石英 ($n_2 = 1.46$) と仮定し、キャビラリーの外部の媒質を空気 ($n_1 = 1.00$)、水 ($n_1 = 1.33$)、及び石英 ($n_1 = 1.46$) と仮定した場合の、キャビラリーの外部の媒質の屈折率 (n_1) の変化に対する $|\Delta\theta|$ の変化を、キャビラリーの外部の各媒質に関して示している。アクリルアミドゲルの屈折率は 1.37 度であると見積もられる。

【0037】(第1の実施形態)の場合、 $n_1 = 1.00$ (空気)、 $n_1 = 1.37$ (アクリルアミドゲル) であるから、(数7) から $|\Delta\theta| = 6.48^\circ$ と計算される。図5の結果から、キャビラリー外部の媒質を水で満たせば ($n_1 = 1.33$)、 $|\Delta\theta| = 1.26^\circ$ となり、キャビラリーに入射する前のレーザビームと、キャビラリーを透過後のレーザビームとがなす屈折角 $\Delta\theta$ が小さくなり、より多くのキャビラリーの中を泳動する試料成分からの蛍光を同時計測できる。キャビラリー外部の媒質をキャビラリーと同じ材料、即ち石英ガラス ($n_1 = 1.46$) で満たした場合を想定すると、 $|\Delta\theta| = 4.40^\circ$ となるので、キャビラリー外部の媒質を水とするほうがより有利である。

【0038】(数7)による解析から、屈折率が空気と水の間の値をもつ媒質、具体的には $n_1 = 1.28$ なる媒質でキャビラリー外部を満たすことができれば、最も $|\Delta\theta|$ を小さくすることができるが、実際にはそのような媒質は通常存在し得ないので、上記の条件では、キャビラリー外部を水で満たすのが最も良い。ここで更に $|\Delta\theta|$ を小さくするためには、図5から、アクリルアミドゲルの屈折率を $n_1 = 1.37$ から $n_1 = 1.40$ に上昇させてやれば良いことがわかる。(数7) で $n_1 = 1.40$ とすれば $|\Delta\theta| = 0.10^\circ$ となり、かなり屈折が小さくなる。アクリルアミドゲルの屈折率を上昇させる方法としては、例えばホルムアミド (屈折率 1.45) を適度濃度混入させてやれば良い。ホルムアミドはウレア同様変成剤であり、10%程度の混入は電気泳動の分解能を上昇させる効果があり、20%以上の混入は泳動速度を低下させてしまう欠点がある (Elect.

rophoresis, 13, 484-486 (1992))。もっともアクリルアミドゲルの屈折率を 1.37 から 1.40 に上昇させるには、10%程度のホルムアミドの混入で十分である。

【0039】図6は、図5の結果を得る際に仮定した条件のうち、キャビラリーの外半径を $R = 0.1\text{ mm}$ から $R = 0.25\text{ mm}$ に変更した場合の、キャビラリーの外部の媒質の屈折率 (n_1) の変化に対する $|\Delta\theta|$ の変化を (数7) を用いて計算し、キャビラリーの外部の各媒質に関して示している。図6と図5とを比較すると、キャビラリーの内半径 r はそのままにして外半径 R を 2.5 倍に増大することで、 $n_1 = 1.00$ 、 $n_1 = 1.33$ の場合の曲線が、右側にシフトしているのがわかる。その結果、アクリルアミドゲルの屈折率 $n_1 = 1.37$ に対して、キャビラリー外部を空気 ($n_1 = 1.00$) で満たしたとき、 $|\Delta\theta| = 0.87^\circ$ と屈折が小さくなり、より多数のキャビラリーの中を泳動する試料成分からの蛍光を同時計測するに適当な条件であると判断できる。

【0040】図7は、キャビラリーの材料が屈折率 $n_2 = 1.46$ で、キャビラリー内部の媒質が屈折率 $n_1 = 1.37$ からなるアクリルアミドゲルであるとき、キャビラリー外部の媒質を、空気 (屈折率 $n_1 = 1.00$)、仮想媒質 (屈折率 $n_1 = 1.28$)、水 (屈折率 $n_1 = 1.33$) とした場合に、キャビラリーの外径 R と内径 $2r$ の比 R/r に対する $|\Delta\theta|$ の変化を、(数7) を使用して計算した結果を示す。キャビラリー外部の媒質が空気 (屈折率 $n_1 = 1.00$) であるとき、 R/r が約 6.6 のとき、 $|\Delta\theta|$ は最小となり、 R/r の低下とともに $|\Delta\theta|$ は増大する。図5、図6 に示す結果と同様に、 $R/r = 5$ では $|\Delta\theta| = 0.87^\circ$ 、 $R/r = 2$ では $|\Delta\theta| = 6.48^\circ$ となり、 $R/r = 5$ の場合の方が、より多くのキャビラリーを同時に照射するに適した条件である。

【0041】キャビラリー外部の媒質が水 (屈折率 $n_1 = 1.33$) であるとき、 R/r が約 1.4 のとき、 $|\Delta\theta|$ は最小となり、 R/r の増加とともに $|\Delta\theta|$ は増大する。通常利用できるキャビラリーでは、 $2 \leq R/r \leq 8$ であり、 $R/r = 1.4$ を有するキャビラリーは

実際には使用できない。図5、図6に示す結果と同様に、 $R/r = 2$ では $|\Delta\theta| = 1.26^\circ$ 、 $R/r = 5$ では $|\Delta\theta| = 2.86^\circ$ となり、 $R/r = 2$ の場合の方が、より多くのキャビラリーを同時に照射するに適した条件である。キャビラリー外部の媒質が仮想媒質（屈折率 $n_1 = 1.28$ ）であるとき、 $R/r = 2$ のとき、 $|\Delta\theta|$ は最小となるが、屈折率 $n_1 = 1.28$ を有する媒質は、通常存在し得ないので、実際にはこのような仮想媒質を使用ことはできない。

【0042】図8は、図5の結果を得る際に仮定した条件のうち、キャビラリーの外半径を $R = 0.1\text{ mm}$ から $R = 0.15\text{ mm}$ に、キャビラリーの材料の屈折率を $n_1 = 1.46$ から $n_1 = 1.60$ に変更した場合の、キャビラリーの外部の媒質の屈折率（ n_2 ）の変化に対する $|\Delta\theta|$ の変化を（数7）を用いて計算し、キャビラリーの外部の各媒質に関して示している。屈折率 $= 1.60$ をもつ材料には、（株）オハラより発売されているPHM53（ガラス品番）がある。図8の結果は図6の場合と同様、アクリルアミドゲルの屈折率 $n_1 = 1.37$ に対して、キャビラリー外部を空気（ $n_2 = 1.00$ ）で満たしたとき、 $|\Delta\theta| = 0.84^\circ$ と屈折が小さくなり、より多数のキャビラリーの中を泳動する試料成分からの蛍光を同時計測するに適当な条件であると判断できる。

【0043】本実施形態では、5本のキャビラリーゲル電気泳動によるDNA塩基配列決定を実施した。使用した装置は図2に示す装置の基本構成のうち、ガラス平面板3の代わりに、蛍光計測用セル25を使用する（図9）。キャビラリーゲルは、長さ50cm、外径0.2mm（外半径、 $R = 0.1\text{ mm}$ ）、内径0.1mm（内半径、 $r = 0.05\text{ mm}$ ）の溶融石英管（ $n_2 = 1.46$ ）に、変性剤として7Mのウレアを含んだ4%T（Total monomer concentration）、5%C（Crosslinking material concentration）の濃度のアクリルアミドを注入した後、ゲル化させて調製した（ $n_1 = 1.37$ ）。上記の R 、 r 、 n_1 、 n_2 の値を（数7）に代入すると、 $|\Delta\theta| = 1.26^\circ$ となる。本実施形態ではキャビラリーゲルによる屈折が十分小さく、5本以上のキャビラリー中を泳動する試料成分から発する蛍光の同時計測に適した条件となっている。試料注入側のキャビラリー末端から30cmの位置で、長さ10mmにわたり、各キャビラリーのポリイミド被覆を除去してレーザ照射部とした。図9のように、このキャビラリーゲル5本を、0.2mmピッチに揃えて配列し、水（ $n_1 = 1.33$ ）を満たした蛍光計測セル25内に固定した。但し、図9はキャビラリーゲルの蛍光計測セル25が配置される近傍のみを示した。

【0044】図10は、蛍光計測セル25の部分のキャビラリー軸に垂直な断面図を示す。この断面図において

て、少なくとも、レーザビームが入射、出射する側の面（全面、又は入射、出射する部分のみでも良い）、及びキャビラリー中を泳動する試料成分から発する蛍光を検出する側の面（全面、又は各キャビラリー中から蛍光を検出する複数の部分のみでも良い）は透明な材料から構成される。蛍光計測セル25内には、各キャビラリーの軸が平行に配置され、各キャビラリーの軸がほぼ同一面となるように固定され、各キャビラリーの外部は水（ $n_1 = 1.33$ ）で満たされている。（第1の実施形態）

10 で使用したと同様の2種のレーザを同軸にした後、ビーム径0.1mmに絞り、蛍光計測セル25の透明壁を介して、各キャビラリーゲルの軸が配列する平面の側方より入射させた。（第1の実施形態）では、蛍光の計測は、キャビラリーゲルが配列する平面に対して垂直方向からガラス平面板3を通して行なうのに対して、本実施形態では、蛍光計測セル25の透明な材料から構成される部分から蛍光の計測を行なう。この点を除けば、蛍光の計測のための構成、条件、蛍光の計測の方法は、（第1の実施形態）と全く同一である。さらに、使用した5種のDNA試料、標識蛍光体、泳動開始点への試料の添加を含む電気泳動条件等も、（第1の実施形態）と全く同一である。このようにして、電気泳動を約3時間行ない、2次元CCDカメラで得られた4種の蛍光に対応する4種の信号の時間変化をコンピュータで解析し、5種の試料のDNA塩基配列を決定した。

【0045】図11は、本実施形態で得られたDNAシーケンス結果のうち、Texas Redで標識されたA成分の電気泳動パターンを示す。図11は、泳動時間30分から60分の範囲の電気泳動パターンを示し、プライマーから約130塩基長までのA成分のパターンを示している（分析した試料は5種ともに標準試料のM13mp1.8である）。図11の右欄に示す数字はキャビラリーパン号を示し、番号1、2、3、4、5のキャビラリー順にレーザビームが入射する。即ち、最上段のキャビラリー1に、最初にレーザビームが入射し、次に次段のキャビラリー2に、キャビラリー1を通過したレーザビームが入射し、最後に、キャビラリー5に、キャビラリー1から4を通過したレーザビームが入射する。図11は、レーザビームが最初に入射するキャビラリー1から遠ざかるキャビラリーの順に、電気泳動パターンを示している。ピーク強度は、キャビラリー1から遠ざかるに従い減少しているが、これはキャビラリーによるレーザの屈折が完全にゼロではないために生じている。キャビラリー5のピーク強度は、キャビラリー1の1/3以下になっているが、それでも十分に高いS/N（塩基長9.1に相当する位置で、 $S/N = 7.34$ である）で泳動ピーク検出が可能である。なお、キャビラリー1のピークにおけるS/Nは、塩基長9.1に相当する位置で、 $S/N = 3.300$ である。

【0046】他の蛍光体で標識された試料成分の電気泳

動パターンも同様に得られており、5本のキャビラリーゲルを使用する電気泳動により、断片を高感度に検出してDNA塩基配列決定を実現できた。なお、図11では、縦軸はそれぞれ、キャビラリー1の所定の塩基長のピークを1として規格化した相対蛍光強度を表しており、各キャビラリーから得る泳動パターンが、厳密に相似形を示していない理由は、各キャビラリーの長さが厳密に同一でないこと、各キャビラリーに充填されるゲルの濃度が厳密に同一でないことによる（後で説明する図13、図14においても同様である）。

【0047】（第3の実施形態）本実施形態は、（第2の実施形態）において、キャビラリーの本数を10本に増やし、キャビラリーゲルを変性剤として7Mのウレアを含んだ4%T（Total monomer concentration）、5%C（Crosslinking material concentration）の濃度のアクリルアミドに10%のホルムアミドを添加して重合させて調製した実施形態である。キャビラリーゲルの組成を（第2の実施形態）と異ならせた結果、アクリルアミドゲルの屈折率は $n_1 = 1.40$ まで上昇した。これら以外の実験条件は（第2の実施形態）と全く同一とした。（数7）から、 $|\Delta\theta| = 0.10$ °と計算され、以下に説明する（第4の実施形態）と同様に、キャビラリーによる屈折がより小さくなり、泳動する試料成分から発する蛍光を高感度に計測でき、10種の試料を10本のキャビラリーゲルを使用する電気泳動により、DNA塩基配列決定を実現できた。

【0048】（第4の実施形態）本実施形態は、空气中にキャビラリーを配置した実施形態である。図12は、空気9中に配置される、ゲル8が充填される10本のキャビラリー1に、レーザビーム2を照射して蛍光を計測する部分のキャビラリー軸に垂直な断面図を示す。使用的キャビラリーは、外径を0.5mm（外半径、R=0.25mm）、内径を0.1mm（内半径、r=0.05mm）とする溶融石英管（ $n_1 = 1.46$ ）とし、10本のキャビラリー1の配列は、図12のようにガラス平面板3上に0.5mmピッチで、図3と同様にして、各キャビラリー軸を平行に配置し各キャビラリー軸がほぼ同一面を成すように固定した。本実施形態では、蛍光計測セルは使用せず、キャビラリー外部の媒質は空気（ $n_1 = 1.00$ ）とした。これら以外の実験条件は（第2の実施形態）と全く同一とした。（数7）から、 $|\Delta\theta| = 0.87$ °と計算され、キャビラリーによる屈折が十分小さくなるので、この実験条件は、各キャビラリーに照射されるレーザ光強度を大きく減衰させることなしに、10本以上のキャビラリー中を泳動する試料成分から発する蛍光を、同時に励起できる条件である。図12に示すように、蛍光の検出は、ガラス平面板3の側、あるいはガラス平面板3の反対側から行なう。

【0049】図13、図14は本実施形態で得られたD

NAシーケンス結果のうち、Texas Redで標識されたA成分の電気泳動パターンである。これは泳動時間30分から60分の電気泳動パターンであり、プライマーから約120塩基長までのA成分のパターンを示している（分析した試料は10種ともに標準試料のM13mp18である）。図13、図14の右欄の数字は、図11と同様にキャビラリー番号を示し、レーザビームは、各キャビラリーを、キャビラリー1、キャビラリー2、…、キャビラリー10の順に照射する。縦軸の相対蛍光強度の意味は図11と同じである。レーザビームは、最初にキャビラリー1に照射され、次いでキャビラリー1を通過したレーザビームがキャビラリー2に照射され、…、キャビラリー1からキャビラリー9を通過したレーザビームがキャビラリー10に照射される。図13、図14は、レーザビームが最初に照射されるキャビラリー1から遠ざかるキャビラリー2、3、…、10から得られる電気泳動パターンを示しており、10本のキャビラリーとも十分なS/N（塩基長91を与えるピークにおいてS/Nは、キャビラリー1で237、キャビラリー4で237、キャビラリー7で110、キャビラリー10で142である（キャビラリー10でのS/Nがキャビラリー7でのS/Nより大きいのは、測定のばらつきと考えられる））で蛍光を計測できた。他の蛍光体で標識された試料成分の電気泳動パターンも図13、図14同様に得られており、10本のキャビラリーゲルを使用する電気泳動により、泳動する試料成分から発する蛍光を高感度に計測でき、DNA塩基配列決定を実現できた。

【0050】（第5の実施形態）本実施形態では（第4の実施形態）において、使用するキャビラリーの外径を0.3mm（外半径、R=0.15mm）、内径を0.1mm（内半径、r=0.05mm）とし、キャビラリーの材料の屈折率は $n_1 = 1.60$ である。具体的にはキャビラリーの材料として、（株）オハラより発売されているPHM5.3（ $n_1 = 1.60$ ）を用いた。これら以外の実験条件は、（第4の実施形態）と全く同一とした。（数7）から、 $|\Delta\theta| = 0.84$ °と計算され、（第4の実施形態）における $|\Delta\theta| = 0.87$ °よりもキャビラリーによる屈折がより小さくなる。従って、レーザビームにより10本のキャビラリー中を泳動する試料成分を実質的に同時に励起でき、10種の試料を1本のキャビラリーゲルを使用する電気泳動により、泳動する試料成分から発する蛍光を高感度に計測でき、DNA塩基配列決定を実現できた。

【0051】（第6の実施形態）本実施形態では、図15に示すように、使用するキャビラリーは2種のキャビラリーから構成され、各キャビラリーは異なる径寸法を有している。使用するキャビラリー10本はそれぞれ、電気泳動分離部分では、外径0.2mm（外半径、R=0.1mm）、内径0.1mm（内半径、r=0.05mm）

mm) の寸法を有するキャビラリー (分離用キャビラリー-27) 、レーザビーム2を照射して蛍光を計測する部分では、外径0.5mm (外半径、R=0.25m) 、内径0.1mm (内半径、r=0.05mm) の寸法を有するキャビラリー (計測用キャビラリー-28) から構成される。図15に示すように、分離用キャビラリー-27と計測用キャビラリー-28とを接続させて、図3、図12と同様にして、ガラス平面上に0.5mmピッチで、計測用キャビラリー-28の軸を平行に保ち、各計測用キャビラリー-28の軸が平面を成すように、ガラス平面上に配列固定した。この時、10組の対向する分離用キャビラリーと計測用キャビラリーの中心軸がそれぞれ一致するようにした。両キャビラリーの材料はいずれも石英 ($n_s=1.46$) であり、接続面は、予め研磨してフラットにした。

【0052】両キャビラリーには、変性剤として7Mのウレアを含んだ4%T (Total monomer concentration) 、5%C (Crosslinking material concentration) の濃度のアクリルアミドを注入した後ゲル化させた。キャビラリーの接続部分は電気的に断線しないように緩衝液に浸し、分離用キャビラリーを泳動し分離した試料成分が、そのまま対向する計測用キャビラリーを泳動するようにした。

【0053】分離用キャビラリーは長さ2.5cm、計測用キャビラリーは長さ1.5cmとした。但し、図15には両キャビラリーの接続部分付近のみを記した。分離用キャビラリーと計測用キャビラリーの接続位置から5cmの位置で、長さ1.0mmにわたり計測用キャビラリーのポリイミド被覆を予め除去して、この位置に図15に示したように、レーザビーム2を照射した。この時、泳動距離は $(2.5+5) \text{ cm} = 30 \text{ cm}$ となる。これら以外の実験条件は (第4の実施形態) と全く同一とした。即ち、本実施形態での装置構成条件は、レーザのキャビラリーによる屈折は十分に小さくして、各キャビラリーに照射されるレーザ光強度を大きく減衰させることなしに、10本のキャビラリーを泳動する試料成分を実質的に同時に励起できる条件であり、10種の試料を10本のキャビラリーゲルを使用する電気泳動により、泳動する試料成分から発する蛍光を高感度に計測でき、DNA塩基配列決定を実現できた。なお、図15に図示していないが、蛍光の検出は、ガラス平面板の側、もしくはガラス平面板の反対側より行なう。

【0054】一般にキャビラリーの価格は、外径が大きく内径が小さいほど、即ち、肉厚になるほどガラスの体積にほぼ比例して高価になる。即ち、本実施形態で用いた分離用キャビラリーと計測用キャビラリーの単位長さ当たりの価格は、後者のほうが8倍も高い。本実施形態では、分離用キャビラリーと計測用キャビラリーの脱着が可能なので、1つの試料に関する計測終了後に分離用

キャビラリーのみを交換して、次の試料に関する計測をでき、コストを低減できる。このことは本実施形態のもう一つの効果である。

【0055】本実施形態で使用した、図15に示す各キャビラリーが異なる寸法をもつ2種のキャビラリーから構成されるキャビラリーを、図10で説明した (第2の実施形態) に適用しても、本実施形態とほぼ同様の結果が得られることは言うまでもない。

【0056】(第7の実施形態) 以上 (第1の実施形態) から (第6の実施形態) では、平面状に配列されたキャビラリーゲルの成す平面に平行に、1方向から各キャビラリー軸を通るようにレーザビームを照射する構成について説明したが、(第1の実施形態) から (第6の実施形態) において、図16に示すように、2方向から各キャビラリー軸を通るようにレーザビームを照射する構成としても良い。図16(a) の構成は、レーザビーム2 (单一波長のレーザ光、又は複数のレーザ光源からの複数波長のレーザ光を混合して同軸にしたレーザ光でも良い) を、半透明鏡29、及び30-1、30-2、30-3により、分岐させて2方向から各キャビラリー軸を通るようにレーザビームを照射する構成である。図16(b) の構成は、2つのレーザビーム2-1、2-2を、対向する2方向から複数のキャビラリーに照射する構成であり、レーザビーム2-1、2-2はそれぞれ单一波長のレーザ光、又は複数のレーザ光源からの複数波長のレーザ光を混合して同軸にしたレーザ光でも良い。図16(a)、(b) の構成では、(第1の実施形態) から (第6の実施形態) において、各キャビラリーに照射されるレーザ光の強度の不均一を、改善してより一様な強度のレーザ光を各キャビラリーに照射することができる。この結果、より多数の本数を使用するキャビラリーアレイ電気泳動が可能となる。なお、図16

(a) の構成では、分岐させて2方向から各キャビラリー軸を通るようにレーザビームを照射するため、レーザ光照射強度が減少するので、高出力のレーザ光源の使用が望ましい。更に、(第1の実施形態) から (第6の実施形態) に、図16(b) の構成を適用する際に、レーザビーム2-1が含む単数、又複数のレーザ光の波長と、レーザビーム2-2が含む単数、又複数のレーザ光の波長とが、同一となるように構成されても、異なるように構成されてもいずれも構わない。

【0057】(第8の実施形態) 以上 (第1の実施形態) から (第7の実施形態) では、全てアクリルアミドゲルを用いたが、もちろんこれ以外の分離用媒体を用いても良い。分離媒体として交換可能なものを用いて、キャビラリーそのものは再利用しても良い。但し、それぞれ分離媒体の屈折率に応じて、例えば、(数7)に基づいて各媒体の屈折率、キャビラリーの寸法の最適化を行なうことが、複数のキャビラリー中を泳動する試料成分から発する蛍光を高感度に効率的に同時計測する場合

に重要である。また(数7)から、 $|\Delta\theta|$ はキャビラリーの外径 $2R$ 、内径 $2r$ それぞれ単独で決まるのではなく、 $|\Delta\theta|$ は外径と内径の比 R/r で決定される。従って、以上に示した各実施形態について、異なる外径 $2R$ 、内径 $2r$ のキャビラリーを用いた場合でも、外径と内径の比 (R/r) が等しければ、ほぼ同様の効果を得ることができる。

【0058】(第9の実施形態)以上(第1の実施形態)から(第8の実施形態)では、複数のキャビラリーゲルを使用したが、単一のキャビラリーゲルを使用しても良いことは言うまでもない。単一のキャビラリーゲルを使用する場合にも、(数7)により与えられるキャビラリーゲルによる、レーザビームの屈折 $|\Delta\theta|$ を最小化して、試料成分が泳動するゲルにレーザビームを照射して、効率良く試料成分からの蛍光を検出することができる。

【0059】最後に簡単に本発明を要約すると、キャビラリーアレイ電気泳動装置において、キャビラリーアレイ又はレーザ光のスキャンを行なうことなく、複数のキャビラリーにレーザ光を実質的に同時に照射して、各キャビラリー中を泳動する試料成分から発する蛍光を実質的に同時に検出し、オンカラム蛍光計測を行なう。即ち、複数のキャビラリーを一平面上に配列させ、配列平面の1つ又は2つの側方よりレーザを、配列平面に平行に照射する。キャビラリーの外半径、内半径、キャビラリー外部の媒質の屈折率、キャビラリーの材料の屈折率、キャビラリー内部の媒質の屈折率の間に所定の関係を満足させて、レーザのキャビラリーによる屈折を十分に小さくし、全てのキャビラリーに十分な強度のレーザ光を照射することにより、高感度、高速、高スループットが簡便に実現する。

【0060】
【発明の効果】本発明によれば、キャビラリーアレイ電気泳動装置において、キャビラリーアレイ又はレーザ光のスキャンを行なうことなく、複数のキャビラリーにレーザ光を実質的に同時に照射して、各キャビラリー中を泳動する試料成分から発する蛍光を実質的に同時に検出し、高感度、高速、高スループットな分析を簡便に達成できるオンカラム蛍光計測を実現できる。

【図面の簡単な説明】
【図1】本発明の一実施形態であり、同一平面上に配列される複数のキャビラリーにこの平面と平行で、試料成分の泳動方向とほぼ直交する方向からレーザを照射するキャビラリーアレイ電気泳動装置の主要部分を示す。
(a) 複数のキャビラリーアレイの平面図、(b) その断面図。

【図2】本発明の第1の実施形態であり、5本のキャビラリーゲルを使用する電気泳動によるDNA塩基配列決定のための装置の基本構成を示す図。

【図3】本発明の第1の実施形態であり、キャビラリー

ゲルを取り巻く媒質を空気とする蛍光計測部分のキャビラリー軸に垂直な断面図。

【図4】本発明の第2の実施形態であり、外半径 R 、内半径 r をもつキャビラリー断面図であり、キャビラリーの軸から、距離 x だけ離れた位置に入射した無限小幅のレーザビームの1本のキャビラリーによる屈折の様子を示す図。

【図5】本発明の第2の実施形態であり、キャビラリーの外半径、内半径、キャビラリー材料の屈折率、ゲルの屈折率、及びキャビラリーの外部の媒質の屈折率と、キャビラリーゲルによるレーザ光の屈折の大きさ $|\Delta\theta|$ との関係を示す図。

【図6】図5の結果を得る際に仮定した条件のうち、キャビラリーの外半径を変更した場合の、キャビラリーの外部の媒質の屈折率の変化に対する $|\Delta\theta|$ の変化を、キャビラリーの外部の各媒質に関して示す図。

【図7】キャビラリーの外半径と内半径の比、及びキャビラリーの外部の媒質の屈折率を変更した場合の $|\Delta\theta|$ の変化を示す図。

【図8】図5の結果を得る際に仮定した条件のうち、キャビラリーの外半径、及びキャビラリーの材料の屈折率を変更した場合の、キャビラリーの外部の媒質の屈折率の変化に対する $|\Delta\theta|$ の変化を、キャビラリーの外部の各媒質に関して示す図。

【図9】本発明の第2の実施形態であり、図2に示す装置の基本構成のうち、ガラス平面板の代わりに、蛍光計測用セルを使用するキャビラリーゲル電気泳動装置の構成を示す図。

【図10】図9の蛍光計測セルの部分のキャビラリー軸に垂直な断面図。

【図11】本発明の第2の実施形態で得られたDNAシークエンス結果のうち、Texas Redで標識されたA成分の電気泳動パターンを示す図。

【図12】本発明の第4の実施形態であり、空気中に配置されるゲルが充填される10本のキャビラリーに、レーザビームを照射して蛍光を計測する部分のキャビラリー軸に垂直な断面図。

【図13】本発明の第4の実施形態において、得られたDNAシークエンス結果のうち、Texas Redで標識されたA成分の電気泳動パターンを示す図。

【図14】本発明の第4の実施形態において、得られたDNAシークエンス結果のうち、Texas Redで標識されたA成分の電気泳動パターンを示す図。

【図15】本発明の第6の実施形態であり、各キャビラリーが異なる径寸法をもつ2本のキャビラリーから構成されるキャビラリーを使用するキャビラリー電気泳動装置のレーザ照射部位を示す図。

【図16】本発明の第7の実施形態であり、2方向から各キャビラリー軸を通るようにレーザビームを照射する構成を示し、(a)はレーザビームを半透明鏡によりレ

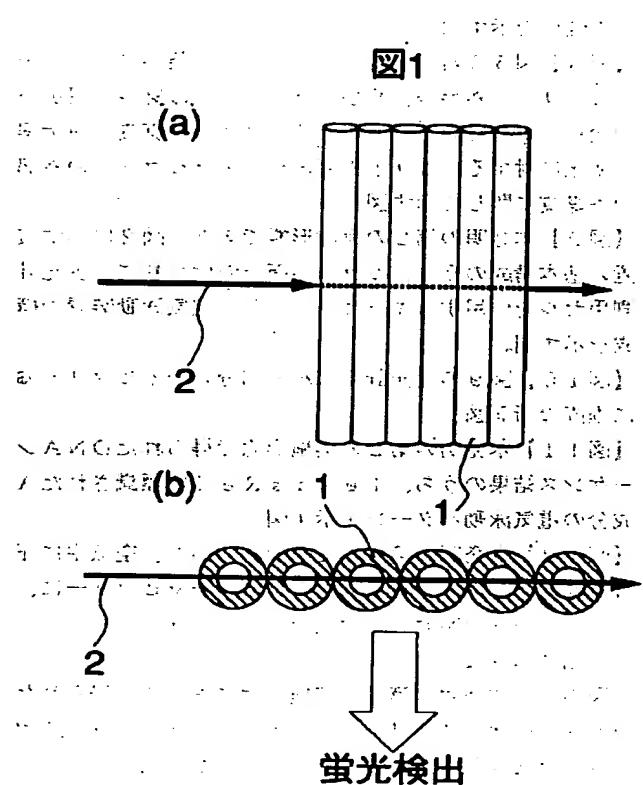
一ザビームを分岐させて2方向から各キャビラリー軸を通るように照射する構成、(b)は2つのレーザビームを、対向する2方向から複数のキャビラリーに照射する構成を示す図。

【符号の説明】

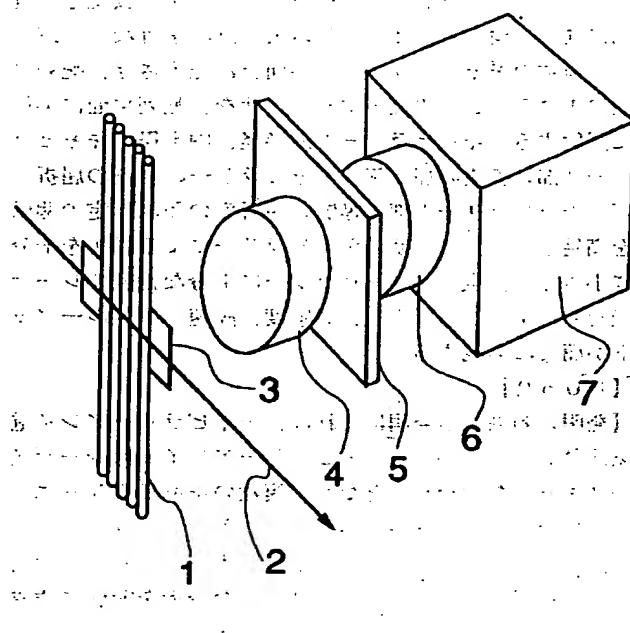
1…キャビラリー、2、2-1、2-2…レーザ光、3…ガラス平面板、4…第1レンズ、5…像分割プリズム及び組み合わせフィルター、6…第2レンズ、7…2次元CCDカメラ、8…アクリルアミドゲル、9…空気、10…入射レーザのキャビラリー軸からのずれの距離(x)、11…キャビラリー外部の媒質からキャビラリーへの入射角(θ_1)、12…キャビラリー外部の媒質からキャビラリーへの屈折角(θ_2)、13…キャビラリー材料からキャビラリー内部の媒質への入射角(θ_3)、14…キャビラリー材料からキャビラリー内*

*部の媒質への屈折角(θ_4)、15…キャビラリー内部の媒質からキャビラリー材料への入射角(θ_5)、16…キャビラリー内部の媒質からキャビラリー材料への屈折角(θ_6)、17…キャビラリー材料からキャビラリー外部の媒質への入射角(θ_7)、18…キャビラリー材料からキャビラリー外部の媒質への屈折角(θ_8)、19…各キャビラリーの軸が配列するキャビラリー配列軸、20…キャビラリー外部の媒質の屈折率(n_1)、21…キャビラリー材料の屈折率(n_2)、22…キャビラリー内部の媒質の屈折率(n_3)、23…キャビラリーの外半径、24…キャビラリーの内半径、25…蛍光計測用セル、26…水、27…分離用キャビラリー、28…計測用キャビラリー、29-1、29-2、29-3、29-4…半透明鏡。

【図1】

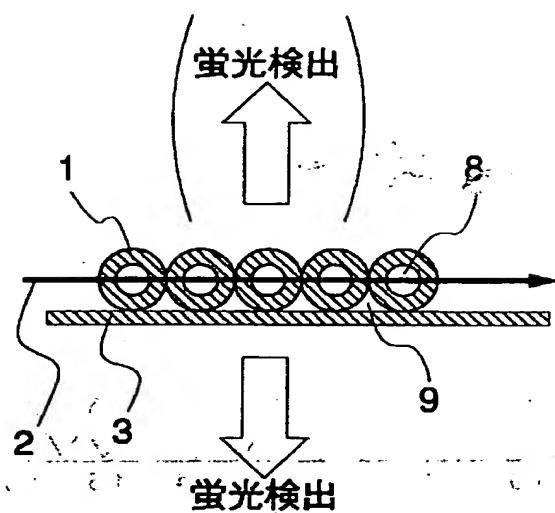


【図2】



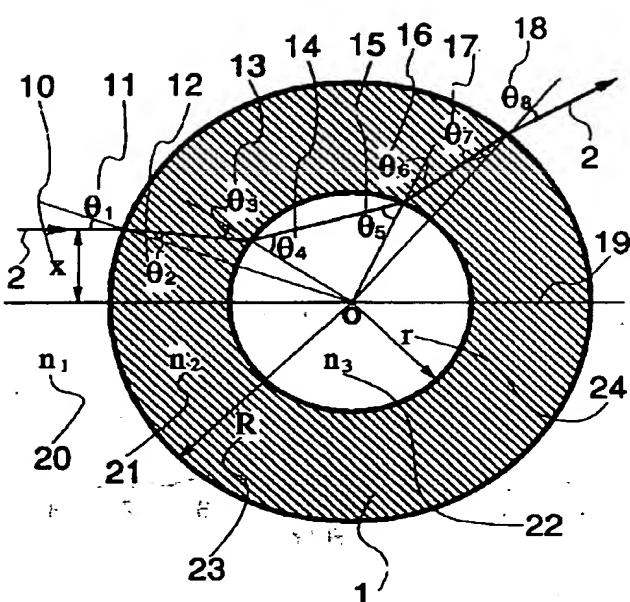
[图 3]

3



[図4]

4

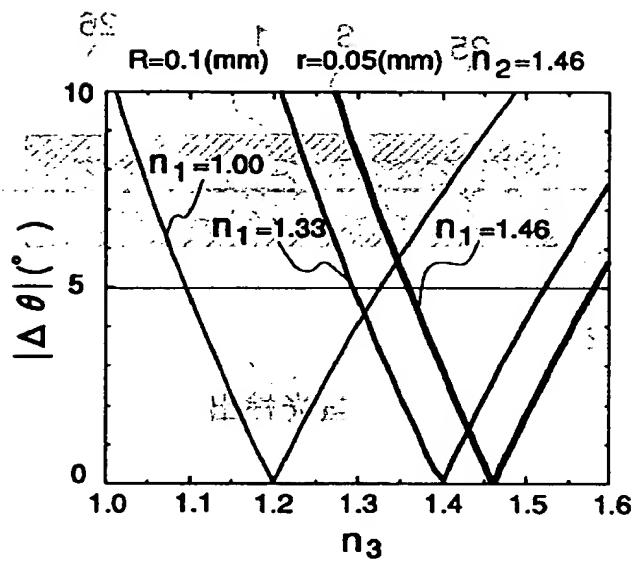


卷之三

【图 5】

卷之三

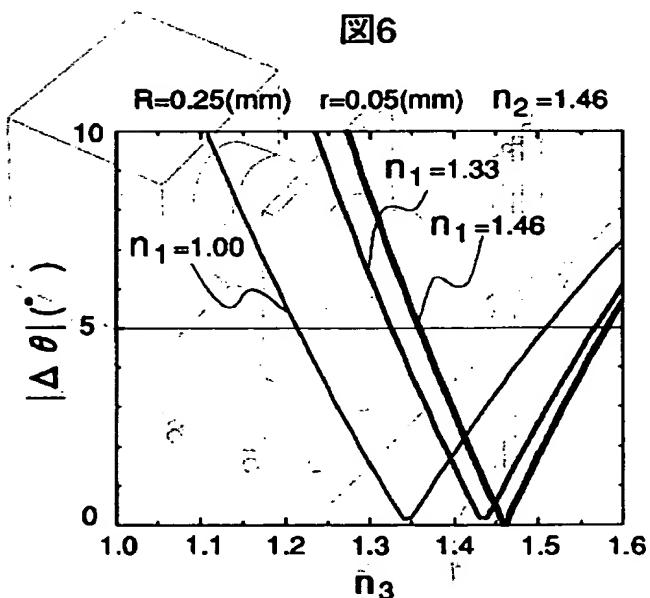
5



1 (2 2 1)

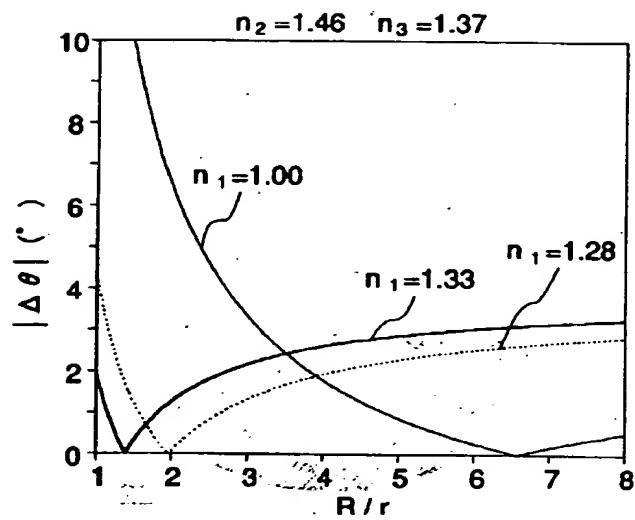
【图6】

6



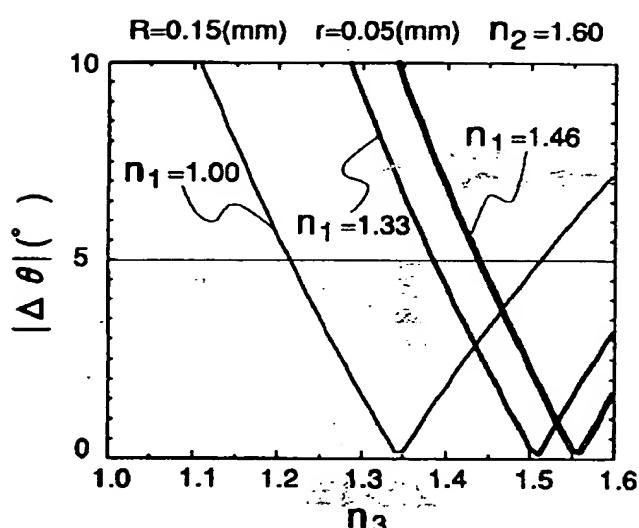
【図7】

図7



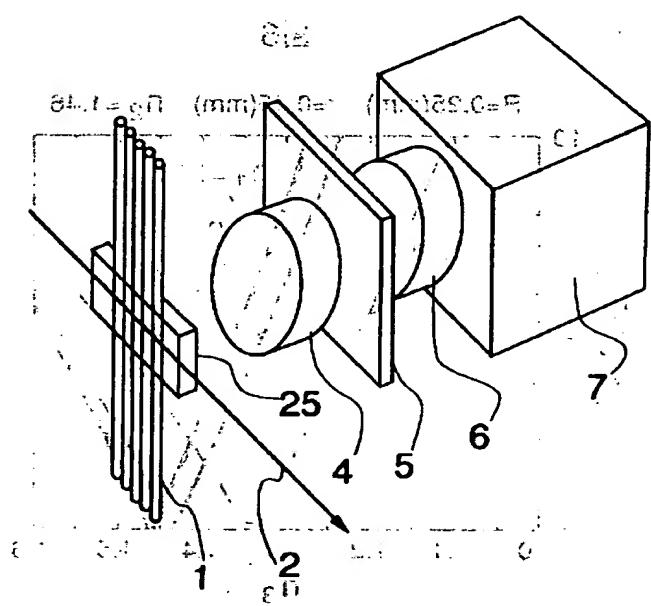
【図8】

図8



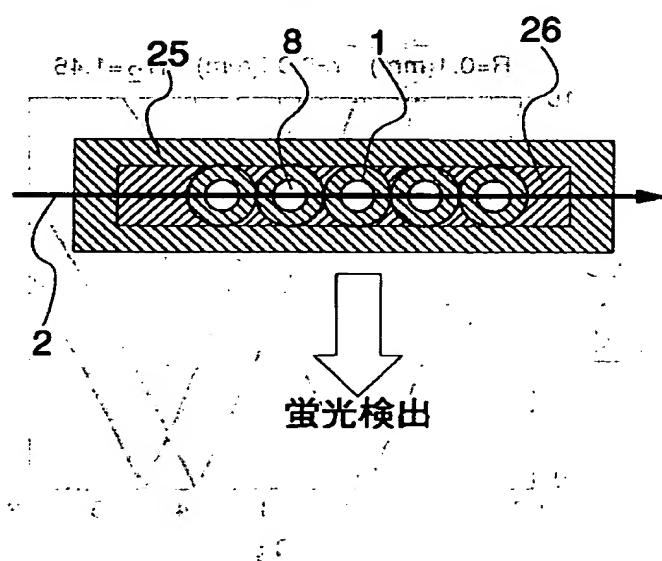
【図9】

図9



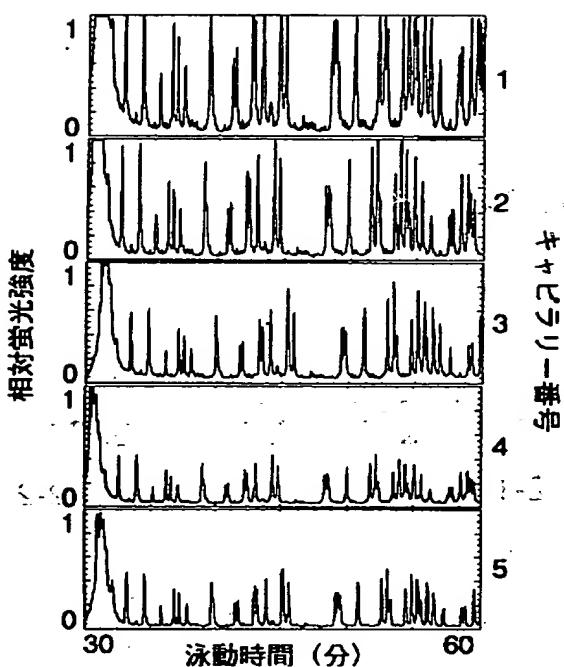
【図10】

図10



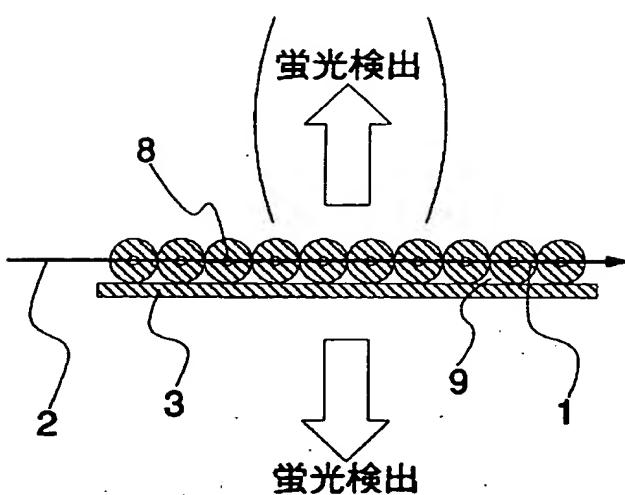
【図11】

図11



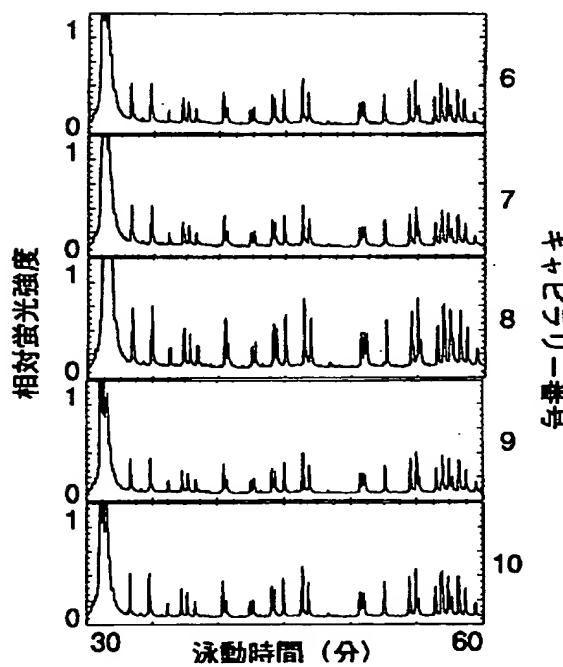
【図12】

図12



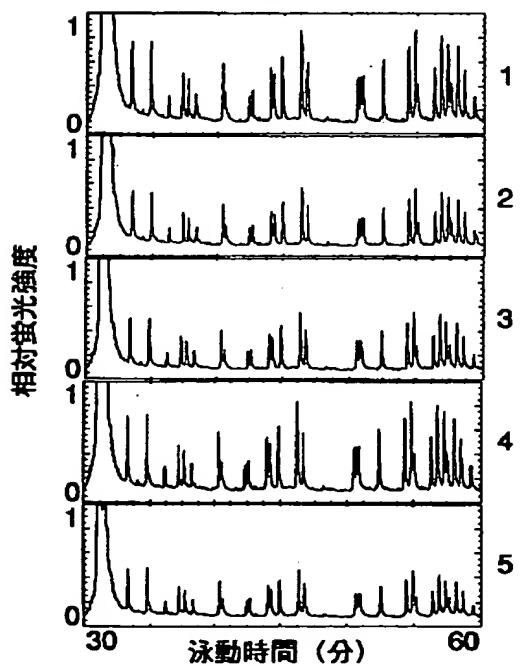
【図14】

図14



【図13】

図13



【図15】

図15

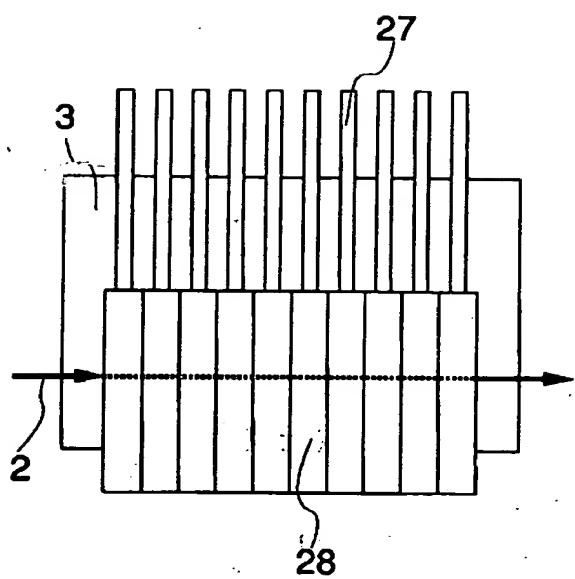
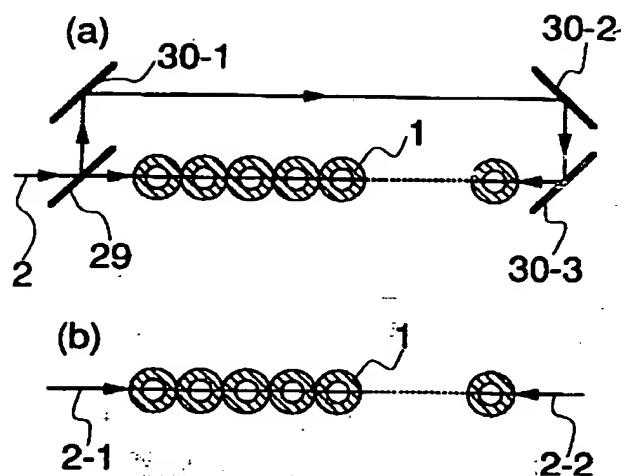


図15

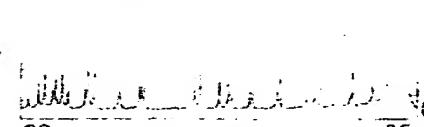
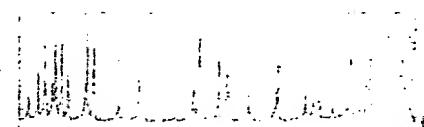
【図16】

図16



特開平9-96623
30

図16



(合) 特開平9-96623